

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-89599

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号  
C 1 2 Q 1/68  
G 0 1 N 33/50  
// C 1 2 N 15/09

F I  
C 1 2 Q 1/68 A  
G 0 1 N 33/50 P  
C 1 2 N 15/00 A

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平9-278142

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年8月25日  
日本癌学会発行の「第56回日本癌学会総会記事」に発表

(71) 出願人 595090392

杉山 治夫

大阪府箕面市船場西2-19-30

(71) 出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72) 発明者 杉山 治夫

大阪府箕面市船場西2-19-30

(72) 発明者 福井 崇史

徳島県徳島市末広5丁目1-38-303

(72) 発明者 木下 盛敏

徳島県板野郡藍住町住吉字神蔵16-7

(74) 代理人 弁理士 三枝 英二 (外10名)

(54) 【発明の名称】 補正競合RT-PCR法によるヒトWT1発現定量法

(57) 【要約】

【課題】 補正された競合RT-PCR法によりヒトWT1・mRNA発現量定量法を提供。

【解決手段】 a) 検体RNAにWT1-RNAスタンダード希釈系列下に逆転写酵素を競合反応させ、b) 得られるcDNAをPCR増幅させ、c) アガロースゲル電気泳動によるWT1・mRNA由来バンドとWT1-スタンダードRNA由来バンドの発光強度比を測定し、d) 検体RNAにβ-アクチン-RNAスタンダード希釈系列下に逆転写酵素を競合反応させ、e) 得られるcDNAをPCR増幅させ、f) アガロースゲル電気泳動によるβ-アクチン・mRNA由来バンドとβ-アクチン-スタンダードRNA由来バンドの発光強度比を測定し、g) 上記c) のWT1・mRNA量値を上記f) のβ-アクチン・mRNA量値で除算し、これに健常人β-アクチン・mRNA発現量平均値を乗算して補正する、補正競合RT-PCR法によるヒトWT1・mRNA発現量の定量方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の工程a)～工程g)を含むことを特徴とする補正競合RT-PCR法によりヒトWT1・mRNAの発現量を定量する方法。

- a) 検体RNAにWT1-RNAスタンダード希釈系列下に逆転写酵素を競合反応させてcDNAを得る工程、  
b) 該cDNAをWT1-センスプライマー及びWT1-アンチセンスプライマーを用いてPCRで増幅させ、アガロースゲル電気泳動を行なう工程、  
c) 該電気泳動により得られるWT1・mRNA由来のバンド及びWT1-スタンダードRNA由来のバンドの発光強度比を測定して検体のWT1・mRNA量を算出する工程、  
d) 検体RNAに $\beta$ -アクチン-RNAスタンダード希釈系列下に逆転写酵素を競合反応させてcDNAを得る工程、  
e) 該cDNAを $\beta$ -アクチン-センスプライマー及び $\beta$ -アクチン-アンチセンスプライマーを用いてPCRで増幅させ、アガロースゲル電気泳動を行なう工程、  
f) 該電気泳動により得られる $\beta$ -アクチン・mRNA由来のバンド及び $\beta$ -アクチン-スタンダードRNA由来のバンドの発光強度比を測定して検体の $\beta$ -アクチン・mRNA量を算出する工程、  
g) 工程c)で得られるWT1・mRNA量値を工程f)で得られる $\beta$ -アクチン・mRNA量値で除算し、これに健常人の $\beta$ -アクチン・mRNA発現量平均値を乗算して補正する工程。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、白血病、固型癌の診断や骨髄移植時期の決定に利用できるヒトWT1のmRNAの発現量を定量する新しい方法に関する。

【0002】また本発明は、上記定量法のためのDNA断片、これを含むプラスミド、スタンダード及びプライマーに関する。

## 【0003】

【従来の技術】WT1遺伝子は、1990年にコールら[Call, K. M. et al., Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus, *Cell*, **60**, 509-520 (1990)]により、ウイルス腫瘍の原因遺伝子として単離された遺伝子である。該遺伝子は、腎及び生殖腺の形成に重要な働きをすることが明らかとなっている。

【0004】1994年に井上らは、WT1遺伝子がほぼ全例の白血病患者に発現していることを見出した[Inoue, K. et al., WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia, *Blood*, **84**, 3071-3079 (1994)]。WT1は、健常人の末梢血では見出されないことから、白血病における微小残存病変(MRD)

の検出への応用が試みられている。その方法としては、ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法[Park, S., et al., *Nature Genet.*, **4**, 415 (1993); Miwa, H., et al., *Leukemia*, **6**, 405 (1993); Miyagi, T., et al., *Leukemia*, **7**, 979 (1993)]やRT-PCR法[Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Inoue, K., et al., *Blood*, **84** (9) 3071-3079 (1994)]が知られている。

【0005】一方、 $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)は、DNA結合蛋白質で、どのような細胞でもほぼ同様に発現していると考えられている。従って、ある特定の遺伝子のmRNA発現を定量する際に、該 $\beta$ -actinの発現量を同時に定量すれば、実際に測定しようとする特定遺伝子のRNA量を比較したいサンプル間で一定になるように補正することができる。

【0006】上記のようにWT1・mRNAや $\beta$ -actin・mRNAの発現を測定する方法として知られている、ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法やRT-PCR法は、半定量法であり、いずれも再現性や定量性に乏しい。事実、例えば、RT-PCR法では、電気泳動後、バンドの発色強度を目視判定するか又はデンストメトリー法により測定する方法が採用されている。

【0007】しかしながら、これらの方法ではエチジウムブロマイド発色強度の直線領域が非常に狭く、またPCRの増幅産物量が必ずしも元の鋳型量を反映しておらず、単純に増幅産物量から鋳型量を推定することはできず、更に検体を希釈したり、PCRのサイクル数を代える操作も必要であり、煩雑で、定量性に乏しい不利があった。

【0008】さらに、正確な定量を行なうためには、実際に定量に用いるRNA量は、サンプル間で補正しておく必要がある。しかるに、一般的に測定に用いられている260nmの吸光度からのmRNAの定量法では、DNAの混入や、RNAのデグラデーションの可能性が考えられるため、確実にmRNAの一定量をサンプリングすることは不可能である。

【0009】最近、これらの方法に代わって、全ての細胞において発現しているとされる $\beta$ -actinの発現量を指標に、サンプル間のRNA量の補正を行うことで、正確な定量値を算出する、標準物質(スタンダード)を用いた競合RT-PCR法が報告されている[Kotake S, et al., *J. Immunol. Methods*, **199** (2), 193-203(1996)]。しかしながら、この方法がWT1の定量に応用された例はない。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】このような理由より、従来のノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法やRT-PCR法に代わって、より正確にヒトWT1遺伝子の発現量を定量できる新しいアッセイ系の開発が望ま

れている。

【0011】従って、本発明の目的は、ヒトWT1・mRNAの発現量を定量可能であって、しかもより再現性が高く、正確に定量できる新しいヒトWT1・mRNAの競合定量法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の結果、上記目的の達成に有効な、WT1・mRNA競合RT-PCR定量法、そのための標準物質（スタンダード）及びプライマーの合成、並びに $\beta$ -actin・mRNA競合RT-PCR定量法、そのためのスタンダード及びプライマーの合成に成功した。そして、これらの利用によって、それぞれヒトWT1・mRNA発現量及び $\beta$ -actin・mRNA発現量を測定し、これらの測定値から補正されたヒトWT1・mRNA発現量を定量する方法を確立し、ここに本発明を完成した。

【0013】即ち、本発明によれば、以下の工程a)～工程g)を含むことを特徴とする補正競合RT-PCR法によりヒトWT1・mRNAの発現量を定量する方法が提供される。

【0014】a) 検体RNAにWT1-RNAスタンダード希釈系列下に逆転写酵素を競合反応させてcDNAを得る工程、

b) 該cDNAをWT1-センスプライマー及びWT1-アンチセンスプライマーを用いてPCRで増幅させ、アガロースゲル電気泳動を行なう工程、

c) 該電気泳動により得られるWT1・mRNA由来のバンド及びWT1-スタンダードRNA由来のバンドの発光強度比を測定して検体のWT1・mRNA量を算出する工程、

d) 検体RNAに $\beta$ -アクチン-RNAスタンダード希釈系列下に逆転写酵素を競合反応させてcDNAを得る工程、

e) 該cDNAを $\beta$ -アクチン-センスプライマー及び $\beta$ -アクチン-アンチセンスプライマーを用いてPCRで増幅させ、アガロースゲル電気泳動を行なう工程、

f) 該電気泳動により得られる $\beta$ -アクチン・mRNA由来のバンド及び $\beta$ -アクチン-スタンダードRNA由来のバンドの発光強度比を測定して検体の $\beta$ -アクチン・mRNA量を算出する工程、

g) 工程c)で得られるWT1・mRNA量値を工程f)で得られる $\beta$ -アクチン・mRNA量値で除算し、これに健常人の $\beta$ -アクチン・mRNA発現量平均値を乗算して補正する工程。

【0015】また、本発明によれば、上記定量法のためのWT1・mRNA及び $\beta$ -actin・mRNAの定量法、これらに利用するスタンダード、プライマー等もそれぞれ提供される。より詳しくは、本発明によれば、まず

(1) 配列番号：1で示され、ヒトのWT1遺伝子を増

幅する際のプライマーがアニーリングする配列を両端に持つDNA断片、(2)該DNA断片を含む組換えプラスミドpWT1、(3)該DNA断片に対応するRNAを用いるヒトWT1・mRNA競合定量用スタンダード、(4)ヒトWT1遺伝子を増幅する際のプライマー配列とプライマー及び(5)上記競合定量用スタンダードとプライマーとを用いてRT-PCR法によりヒトWT1・mRNAを定量する方法が提供される。

【0016】また、本発明によれば、(6)配列番号：2で示され、ヒトの $\beta$ -actin遺伝子を増幅する際のプライマーがアニーリングする配列を両端に持つDNA断片、(7)該DNA断片を含む組換えプラスミドpACT、(8)該DNA断片に対応するRNAを用いるヒト $\beta$ -actin・mRNA競合定量用スタンダード、(9)該ヒト $\beta$ -actin遺伝子を増幅する際のプライマー配列とプライマー及び(10)上記競合定量用スタンダードとプライマーを用いてRT-PCR法によりヒト $\beta$ -actin・mRNAを定量する方法も提供される。

【0017】本発明の補正競合RT-PCR測定法によるヒトWT1・mRNA発現量は、上記工程c)で得られるヒトWT1・mRNA量値を、上記工程f)で得られるヒト $\beta$ -actin・mRNA量値で除算し、この値に健常人から得られたヒト $\beta$ -actin・mRNA発現量の平均値を乗算して補正することにより得られる。

【0018】かかる本発明方法によれば、ヒトWT1・mRNA量を、従来法では得られない正確な値として得ることができる。しかも本発明に係わる競合RT-PCR定量法は、基本的には一つのチューブでスタンダードとの競合反応を行なわせるものであるため、正確な鋳型量を反映する定量値が得られ、また反応チューブも少なくでき、測定に費やす労力等を軽減できる利点もある。

【0019】本明細書において、アミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸、制限酵素、その他に関する略号による表示は、IUPAC及びIUPAC-IUBによる命名法乃至規定及び「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(平成2年11月、特許庁調整課審査基準室)に従うものとする。

【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明方法について詳細に開示する。

【0021】本発明によれば、まず配列番号：1で示されるDNA断片、該DNA断片を含む組換えプラスミドpWT1、該DNA断片に対応するRNAを用いるヒトWT1・mRNA競合定量用スタンダード及び該スタンダードを用いてRT-PCR法によりヒトWT1・mRNAを定量する方法が提供される。

【0022】ここで、上記配列番号：1で示されるDNA断片は、ヒトWT1・mRNAを逆転写反応する際の

プライマー及びヒトWT1・cDNAをPCR増幅する際のプライマーがアニーリングする配列を両端に持つ。上記DNA断片のPCR産物のサイズ及び内部配列はヒトWT1とは異なる点に特徴がある。また該DNA断片(変異DNA)に相補的なプラス鎖RNAは、ヒトWT1・mRNA競合定量用のRNAスタンダードとして有用である。

【0023】上記DNA断片及びこれを保有する組換え体プラスミドは、一般的な遺伝子組換え技術に従い製造できる。得られる組換え体プラスミドを細菌、ウイルス等の微生物に組み込んで形質転換させ、該形質転換体より、上記変異DNAに対応する相補的なプラス鎖RNAを得ることができる。

【0024】上記プラスミドの製法につき詳述すれば、これは好ましくはPCR法を利用した変異導入法等により製造できる。該方法において用いられるDNA断片調製のための鋳型DNAは、PCR法を行い得るものなら何でもよく、特定のものに限定されない。該鋳型DNAの抽出は、公知の方法、例えばフェノール/クロロホルム法(Sambrook J., et al., Molecular Cloning. In a laboratory manual cold spring harbor laboratory press, New York, 1990)等により実施できる。

【0025】また、上記DNA断片の調製は、例えば、鋳型DNAの標的領域を、DNA断片調製のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いてPCR法にて増幅させる。

【0026】上記で得られるDNA断片は、例えばこれを3%アガロースゲル電気泳動後、ゲルより切り出して精製し、pBluescript II SK<sup>+</sup>等の発現ベクターに直接挿入するか又はpUC19やpCRII等のクローニングベクターに挿入した後、発現ベクターにサブクローニングして、微生物、例えば大腸菌を形質転換させることができる。かくして得られる形質転換大腸菌を常法に従い培養し、プラスミドを精製して、所望のpWT1を取得できる。このプラスミドpWT1は、これを用いて大腸菌(E.coli)JM109コンピテント細胞を形質転換させることができる。かくして得られる形質転換大腸菌の一具体例は、本発明者によりOAL777と命名されている。

【0027】以下、WT1-RNAスタンダード及びこれを用いたWT1・mRNAの定量法につき詳述する。

【0028】WT1-RNAスタンダードの調製は、例えば大腸菌のバクテリオファージT7由来のDNA依存RNAポリメラーゼを用いて、次のようにして調製できる。即ち、前記のごとくして得られる本発明pWT1のT7プロモーターの下流に挿入されたDNA断片を鋳型として、まずRNAを合成し、その後混在するDNAをDNaseを用いて分解し、フェノール抽出により精製する。かくして、所望のRNAスタンダード液を調製できる。

【0029】得られるRNAスタンダード溶液は、濃度コピー数で表され、引き続きヒトWT1・mRNAの定量の際には、例えば0.2mg/mlウシ胸腺tRNA溶液で希釈して $10^1$ コピー/ $\mu$ l、 $10^2$ コピー/ $\mu$ l、 $10^3$ コピー/ $\mu$ l、 $10^4$ コピー/ $\mu$ l、 $10^5$ コピー/ $\mu$ l、 $10^6$ コピー/ $\mu$ l、 $10^7$ コピー/ $\mu$ l、 $10^8$ コピー/ $\mu$ l、 $10^9$ コピー/ $\mu$ l及び $10^{10}$ コピー/ $\mu$ lの溶液のRNAスタンダード希釈系列として利用できる。

【0030】RNAスタンダードによるWT1 mRNAの定量は、上記のようにして調製されたRNAスタンダード希釈系列を利用して、例えば次の競合定量測定法により実施できる。

【0031】即ち、この方法では、例えば、まず培養細胞K562からAGPC法〔Chomczynski, P. and Sacchi, N., Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987)〕により抽出したトータルRNAに、各種濃度に希釈したRNAスタンダード溶液及び逆転写用プライマーを加え、次いでこの溶液を80℃程度で5分間程度加温し、直ちに氷中で冷却し、逆転写酵素を添加して37℃程度で60分間程度反応させ、その後、95℃程度で5分間程度加温して逆転写酵素を失活させて、cDNA溶液を調製する。

【0032】次に、得られたcDNA溶液にセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを加えてPCR法を実施し、増幅されたDNAを3%アガロースゲル電気泳動して、K562WT1・mRNA由来のバンドと、スタンダードRNA由来のバンドの比をデンストメトリー法により解析し、2本のバンドの発光強度の比を求める。かくして、K562のWT1・mRNA量を定量できる。

【0033】本発明によれば、また配列番号：2で示されるDNA断片、該DNA断片を含む組換えプラスミドpACT、該DNA断片に対応するRNAを用いたヒト $\beta$ -actin・mRNA競合定量用スタンダード及び該スタンダードを用いてRT-PCR法によりヒト $\beta$ -actin・mRNAを定量する方法が提供される。以下この方法につき詳述する。

【0034】配列番号：2で示されるDNA断片は、ヒト $\beta$ -actin・mRNAを逆転写反応する際のプライマー及びヒト $\beta$ -actin・cDNAをPCR増幅する際のプライマーがアニーリングする配列を両端に持つことを特徴とする。該DNA断片はまた、そのPCR産物のサイズ及び内部配列においてヒト $\beta$ -actinとは異なることをも特徴とする。該DNA断片に相補的なプラス鎖RNAは、ヒト $\beta$ -actin・mRNA競合定量用RNAスタンダードとして有用である。

【0035】上記DNA断片(変異DNA断片)及びこれを保有する組換え体プラスミドは、一般的な遺伝子組

換え技術に従い製造できる。該組換え体プラスミドを細菌、ウイルス等の微生物に組み込んで形質転換させた形質転換体より、上記変異DNAに対応する相補的プラス鎖RNAを得ることができる。

【0036】該方法につき詳述すれば、所望のプラスミドは、HBV・DNAを鋳型として、PCR法を利用した変異導入法等により製造できる。DNA断片調製のための鋳型DNAは、PCR法を行い得るものなら何でもよく、特定のものに限定されない。該鋳型DNAの抽出は例えば前述したフェノール/クロロホルム法等により実施できる。

【0037】DNA断片の調製は、PCR法により、即ち、鋳型DNAの標的領域を、DNA断片調製のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いて、PCR法にて増幅させることにより実施できる。プラスミドpACTは、上記で得られるDNA断片を、例えば3%アガロースゲル電気泳動後、ゲルより切り出して精製し、pBluescript II SK<sup>+</sup>等の発現ベクターに直接挿入するか又はpUC19やpCRII等のクローニングベクターに挿入した後、発現ベクターにサブクローニングして、微生物、例えば大腸菌を形質転換させ、かくして得られる形質転換体を常法に従い培養することにより調製できる。このプラスミドpACTは、これを用いて大腸菌(E.coli)JM109コンピテント細胞を形質転換させ得る。かくして得られる形質転換大腸菌の一具体例は、本発明者によりOAL8888と命名されている。

【0038】上記 $\beta$ -アクチン-RNAスタンダード及びこれを用いた $\beta$ -actin・mRNAの定量法につき詳述すると、該RNAスタンダードの調製は、例えば大腸菌のバクテリオファージT7由来のDNA依存RNAポリメラーゼを用いて調製できる。即ち、上記pACTのT7プロモーターの下流に挿入されたDNA断片を鋳型として、まずRNAを合成し、その後混在するDNAをDNaseを用いて分解し、フェノール抽出により精製することによりRNAスタンダードを調製できる。

【0039】かくして得られるRNAスタンダード液は、濃度コピー数で表され、引き続きヒト $\beta$ -actin・mRNAの定量の際には、例えば0.2mg/mlウシ胸腺tRNA溶液で希釈して $10^1$ コピー/ $\mu$ l、 $10^2$ コピー/ $\mu$ l、 $10^3$ コピー/ $\mu$ l、 $10^4$ コピー/ $\mu$ l、 $10^5$ コピー/ $\mu$ l、 $10^6$ コピー/ $\mu$ l、 $10^7$ コピー/ $\mu$ l、 $10^8$ コピー/ $\mu$ l、 $10^9$ コピー/ $\mu$ l及び $10^{10}$ コピー/ $\mu$ lの希釈系列として利用できる。

【0040】RNAスタンダードによる $\beta$ -actin・mRNAの定量は、上記のようにして調製されたRNAスタンダード希釈系列を利用して、競合定量測定法により実施できる。

【0041】この方法では、例えば、まず培養細胞K5

62からAGPC法により抽出したトータルRNAに、各種濃度に希釈したRNAスタンダード溶液及び逆転写用プライマーを加え、次いでこの溶液を80℃程度で5分間程度加温し、直ちに氷中で冷却し、逆転写酵素を添加して37℃程度で60分間程度反応させ、その後、95℃程度で5分間程度加温して逆転写酵素を失活させることにより、cDNA溶液を調製する。

【0042】次に、得られたcDNA溶液にセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを加えてPCR法により増幅し、3%アガロースゲル電気泳動して、K562 $\beta$ -actin・mRNA由来のバンドと、スタンダードRNA由来のバンドの比をデンストメトリー法により解析し、2本のバンドの発光強度の比を求める。かくして、K562の $\beta$ -actin・mRNA量を定量できる。

【0043】本発明に係わる、補正競合RT-PCR法により補正されたヒトWT1・mRNA発現量を測定する方法は、次の通り実施される。即ち、まず、前記競合RT-PCR法で得られたヒトWT1・mRNAの値を、同競合RT-PCR法で得られたヒト $\beta$ -actin・mRNAの値で除算して、WT1・mRNAの発現量比を得る。次いで、健常人から末梢血を採取し、単核球を分取し、RNAを抽出後、トータルRNA1 $\mu$ gを用いて $\beta$ -actin・mRNA発現量を測定し、健常人からの単核球における $\beta$ -actin・mRNA発現平均値を算出する。この平均値を、前記で得られたWT1・mRNAの発現量比に乗算して、WT1・mRNA発現量補正值を得る。かくして得られる補正值が、本発明補正競合RT-PCR法により得られる所望のヒトWT1・mRNA発現の発現量である。

【0044】かかる本発明方法に従えば、従来法では得られなかった正確なヒトWT1・mRNA発現量が得られる。即ち、従来法に従えば、発現量比(WT1/ $\beta$ -アクチン)が得られるのみであり、これによるサンプル間の相対的比較しか行ない得なかったのに対し、本発明方法によれば、検体中の絶対的WT1・mRNA値が正確に定量できるのである。

【0045】

【発明の効果】本発明によれば、白血病、固型癌の診断及び骨髄移植の時期の決定等に有効な、ヒトWT1・mRNA発現の定量測定法が提供される。また本発明によれば、ヒトWT1・mRNA競合定量用スタンダード、該スタンダードのためのRNAに対応するDNA断片、これを保有するプラスミド、之等を用いるヒトWT1・mRNAの定量法、並びにヒト $\beta$ -actin・mRNA競合定量用スタンダード、該スタンダードのためのRNAに対応するDNA断片、これを保有するプラスミド、之等を用いるヒト $\beta$ -actin・mRNAの定量法も提供される。

【0046】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例をあげる。

【0047】

【実施例1】WT1スタンダードによるWT1・mRNAの定量

1-1. プライマーの調製

本例において用いたプライマーFWT1 STD、RWT1 STD、WT1-RT、WT1-F及びWT1-Rの塩基配列をそれぞれ配列番号：3、4、5、6及び7に示す。

【0048】配列番号：5に示す配列のWT1-RTは、逆転写反応用のプライマーであり、ヒトWT1・mRNA [Gessler, M., et al., Homozygous deletion in Wilms tumors of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping, *Nature.*, 343 (6260), 774-778 (1990)] の1801-1780の配列に相当する。

【0049】配列番号：6及び7に示す配列のWT1-F及びWT1-Rは、PCR用のプライマーであり、それぞれ同WT1・mRNAの1319-1339及び1710-1730の配列に相当する。

【0050】また配列番号：3及び4に示す配列のFWT1 STD及びRWT1 STDは、共にDNA断片作成用のプライマーである。FWT1 STD (配列番号：3) の5' 末端の1番目から21番目は、同WT1・mRNAの1319-1339に相当し、22番目から42番目は、同WT1・mRNAの1388-1408に相当し、43番目から69番目は、HBV・DNA [Kobayashi, M., et al., Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus DNA of subtype adr and its conserved gene organization, *Gene.*, 30, 227-232 (1984)] の1903-1929の配列に相当する。

【0051】また、RWT1 STD (配列番号：4) の5' 末端の1番目から22番目は、同WT1・mRNAの1780-1801に相当し、23番目から43番目は、同WT1・mRNAの1710-1730に相当し、44番目から70番目は、同HBV・DNAの1831-1857の配列に相当する。

【0052】1-2. DNA断片の調製

DNA断片の調製のための鋳型となるHBV・DNAをB型肝炎患者の血清から抽出した。即ち、血清10 $\mu$ lに0.2M NaOHを10 $\mu$ l加え、37℃で15分間インキュベートした後、0.2M HClを10 $\mu$ l加えたものをHBV・DNA抽出液とした。

【0053】上記HBV・DNA抽出液5 $\mu$ lを鋳型とし、FWT1 STDとRWT1 STDをプライマーとして、AmpTaq (Perkin Elmer社)を用い、PCRで増幅した。PCR反応は、94℃で1分間、58℃で1分間及び72℃で2分間のサイクルを35回行った。

【0054】上記で増幅された184bpのWT1 HB

V断片を、3%アガロースゲル電気泳動後、ゲルより切り出して精製し、クローニングベクターpCRII (Invitrogen社)にクローニングした後、EcoRIでインサートを切り出し、クローニングベクターpBluescriptII SK<sup>+</sup> (Stratagene社)のEcoRIサイトにサブクローニングして、所望の組換えプラスミドpWT1を得た。

【0055】かくして得られたプラスミドpWT1を用いてE. coli JM109コンピテント細胞 (宝酒造社)を形質転換して、OAL7777細胞を得た。

【0056】この細胞を50 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを含むLB寒天培地に接種し、OAL7777細胞を単離し、大量培養によって2.5mgのpWT1を回収した。

【0057】上記で得られたpWT1の制限酵素地図を図1に示す。

【0058】図中、枠で囲んだ部分 (カラム) がRNAスタンダードとして転写される部分であり、白カラムは挿入されたDNA断片部分を、黒カラムはクローニングベクターpCRIIのマルチクローニングサイトの一部分を、斜線を付したカラムはT7プロモーター領域と発現ベクターpBluescriptII SK<sup>+</sup>のマルチクローニングサイトの一部分を、実線はベクター pBluescriptII SK<sup>+</sup>部分をそれぞれ示す。

【0059】1-3. RNAスタンダードの調製  
RNAスタンダードの調製は、大腸菌のバクテリオファージT7由来のDNA依存RNAポリメラーゼを用い、pWT1のT7プロモーターの下流に挿入したDNA断片を鋳型として、次の通り行われた。

【0060】即ち、50 $\mu$ gのpWT1に挿入した競合DNA断片の下流にあるBamHIサイトを、50ユニットのBamHIで一夜消化させてpWT1を直鎖DNAとし、フェノール・クロロホルム抽出により精製した。この操作により、750.5 $\mu$ g/mlの直鎖pWT1を100 $\mu$ l回収した。

【0061】上記で得られた溶液1 $\mu$ l (750.5ng)に、2 $\mu$ lの10 $\times$ RNAポリメラーゼ緩衝液 (400mMトリス、60mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウム及び20mM塩酸スベルミジン、pH 7.5)、9 $\mu$ lの滅菌蒸留水、それぞれ1 $\mu$ lの200mM DTT、2mg/mlの牛血清アルブミン、10mM ATP、10mM CTP、10mM GTP、10mM UTP及び40ユニット/ $\mu$ l RNAaseインヒビター (Promega社)を順次加え、37℃で60分間反応させた。次に、この溶液に5mg/ml DNase Iを1 $\mu$ l加え、37℃で15分間反応させ、フェノール抽出により精製して、最終的に195.3mg/mlのスタンダードRNA溶液を調製した。

【0062】このスタンダード溶液は、300ntのR



NAからなることから、 $1.1 \times 10^{15}$ コピー/ $\mu$ lに相当する。

【0063】上記RNAスタンダード溶液を0.2mg/mlウシ胸腺tRNA (Boehringer Mannheim社) 溶液で希釈して、 $10^1$ コピー/ $\mu$ l、 $10^2$ コピー/ $\mu$ l、 $10^3$ コピー/ $\mu$ l、 $10^4$ コピー/ $\mu$ l、 $10^5$ コピー/ $\mu$ l、 $10^6$ コピー/ $\mu$ l、 $10^7$ コピー/ $\mu$ l、 $10^8$ コピー/ $\mu$ l、 $10^9$ コピー/ $\mu$ l及び $10^{10}$ コピー/ $\mu$ lの各溶液を調製して、RNAスタンダード系列を得た。

【0064】1-4. RNAスタンダードによるWT1・mRNAの定量

1-3で調製したRNAスタンダード系列を用いて、培養細胞K562におけるWT1・mRNAを以下の通り競合定量した。

【0065】即ち、K562細胞よりAGPC法によってRNAを抽出した。即ち、K562細胞にD液(4M グアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム、0.5%ザルコシル、0.1M2-メルカプトエタノール、pH7.0)500 $\mu$ lを加え、酢酸ナトリウム50 $\mu$ l、水飽和フェノール450 $\mu$ l及びクロロホルム/イソアミルアルコール(49:1)100 $\mu$ lを順次添加し、10分間激しく混和した。速やかに15分間氷冷し、遠心分離(1500rpm、10分間)して、上層を新しいチューブにとり、イソプロパノール500 $\mu$ lをこれに加えた。転倒混和後、-80℃で10分間冷却し、遠心分離(1500rpm、10分間)して、上清を取り除き、真空デシケーターにて吸引乾燥し、これに滅菌蒸留水を適量加え、沈殿を溶解してトータルRNA溶液とし、OD260での吸光度を測定し、トータルRNA濃度を定量した。

【0066】次いで、トータルRNAを4本のチューブにそれぞれ0.25 $\mu$ gずつサンプリングし、それぞれに $10^1$ コピー/ $\mu$ l、 $10^3$ コピー/ $\mu$ l、 $10^5$ コピー/ $\mu$ l及び $10^7$ コピー/ $\mu$ lのRNAスタンダード系列を1 $\mu$ lずつ及び10pmol/ $\mu$ lのWT1-Rプライマー1 $\mu$ lずつを添加した後、全量が7 $\mu$ lになるように滅菌蒸留水を加えた。80℃で5分間加温して直ちに水中で冷却し、逆転写酵素溶液8 $\mu$ lを添加して37℃で60分間反応させた。反応後、95℃にて5分間加温して逆転写酵素を失活させてcDNA溶液とした。

【0067】得られた各cDNA溶液から3 $\mu$ lを別のチューブにとり、20pmol/ $\mu$ lのWT1-FプライマーとWT1-Rプライマーをそれぞれ1 $\mu$ lずつ用い、Ampli Taq Gold (Perkin Elmer社)を用い、PCRで増幅した。PCR反応は、94℃で12分間加温した後、94℃で1分間、65℃で2分間のサイクルを40回行った。

【0068】得られた各反応液10 $\mu$ lにつき3%アガ

ロースゲル電気泳動を行った。その結果を図2に示す。

【0069】該図2に示される412bpのバンドはK562のWT1・mRNA由来のものであり、162bpのバンドは、添加したスタンダードRNA由来のものである。

【0070】之等412bpと162bpのバンドが明瞭に認められるRNAスタンダード系列の $10^7$ コピー/ $\mu$ lを添加したレーンを、ビデオデンストメータTIAS-2300S (ACIジャパン社)を用いて、デンストメトリ法〔真鍋敬、生物物理化学、26(4)、321(1982)〕により解析して、2本のバンドの発光強度の比を求めた。これは映像をビデオカメラを用いて512X512画素、256階調の濃度データとして、画像処理装置TIAS-2300Sにて取り込み、パソコンPC9800で演算処理して画像上のスポットの定量を行ったものである。

【0071】上記より、K562のWT1・mRNA量は、 $7.77 \times 10^6$ コピー/mlと計算された。この結果より、WT1・mRNAの定量が可能となった。

【0072】

【実施例2】 $\beta$ -actinスタンダードによるWT1・mRNAの定量

2-1. プライマーの調製

本例において用いたプライマーFACTSTD、RACSTD、ACT-RT、ACT-F及びACT-Rの塩基配列を配列番号：8、9、10、11及び12に示す。

【0073】配列番号：10に示す配列のACT-RTは、逆転写反応用のプライマーであり、ヒト $\beta$ -actin・mRNA [Ponte, P., et al., Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA, Nucleic Acid Res., 12(3), 1687-1696 (1984)] の683-659の配列に相当する。

【0074】配列番号：11及び12に示す配列のACT-F及びACT-Rは、PCR用のプライマーであり、それぞれ同 $\beta$ -actin・mRNAの144-163及び616-636の配列に相当する。

【0075】また、配列番号：8及び9に示す配列のFACTSTD及びRACTSTDは、共にDNA断片作成用のプライマーであり、FACTSTD (配列番号：8) の5'末端の1番目から20番目は、同 $\beta$ -actin・mRNAの144-163に相当し、21番目から40番目は、同 $\beta$ -actin・mRNAの382-401に相当し、41番目から64番目は、HBV-DNAの1742-1765の配列に相当する。また、RACTSTD (配列番号：9) の5'末端の1番目から25番目は、同 $\beta$ -actin・mRNAの659-683に相当し、26番目から46番目は、同 $\beta$ -actin・mRNAの616-636に相当し、

47番目から67番目は、同HBV・DNAの1832-1852の配列に相当する。

#### 【0076】2-2. DNA断片の調製

DNA断片の調製のための鑄型となるHBV・DNAをB型肝炎患者の血清から抽出した。即ち、血清10 $\mu$ lに0.2M NaOHを10 $\mu$ l加え、37℃で15分間インキュベートした後、0.2M HClを10 $\mu$ l加えたものをHBV・DNA抽出液とした。

【0077】上記HBV・DNA抽出液5 $\mu$ lを鑄型とし、FACTSTDとRACTSTDをプライマーとして、AmpTaq (Perkin Elmer社)を用い、PCRで増幅した。PCR反応は94℃で1分間、58℃で1分間、72℃で2分間のサイクルを35回行った。

【0078】上記で増幅された197bpのACTHBV断片を、3%アガロースゲル電気泳動後、ゲルより切り出して精製し、クローニングベクター pCRII (Invitrogen社)にクローニングした後、EcoRIでインサートを切り出し、クローニングベクター pBluescriptII SK<sup>+</sup> (Stratagene社)のEcoRIサイトにサブクローニングして、所望の組換えプラスミドpACTを得た。

【0079】かくして得られたプラスミドpACTを用いてE. coli JM109コンピテント細胞(宝酒造社)を形質転換し、OAL888細胞を得た。

【0080】この細胞を50 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを含むLB寒天培地に接種し、OAL888細胞を単離し、大量培養によって1.6mgのpACTを回収した。

【0081】上記で得られたpACTの制限酵素地図を図3に示す。

【0082】図中、枠で囲んだ部分(カラム)がRNAスタンダードとして転写される部分であり、白カラムは挿入されたDNA断片部分を、黒カラムはクローニングベクターpCRIIのマルチクローニングサイトの一部分を、斜線を付したカラムはT7プロモーター領域と発現ベクターpBluescriptII SK<sup>+</sup>のマルチクローニングサイトの一部分を、実線はベクター pBluescriptII SK<sup>+</sup>部分をそれぞれ示す。

#### 【0083】2-3. RNAスタンダードの調製

RNAスタンダードの調製は、大腸菌のバクテリオファージT7由来のDNA依存RNAポリメラーゼを用いて、pACTのT7プロモーターの下流に挿入したDNA断片を鑄型として次の通り行われた。

【0084】即ち、50 $\mu$ gのpACTに挿入したDNA断片の下流にあるBamHIサイトを、50ユニットのBamHIで一夜消化させてpACTを直鎖DNAとし、フェノール・クロロホルム抽出により精製した。この操作により、467.4 $\mu$ g/mlの直鎖pACTを100 $\mu$ l回収した。

【0085】上記で得られた溶液1 $\mu$ l(467.4ng)に、2 $\mu$ lの10 $\times$ RNAポリメラーゼ緩衝液(400mMトリス、60mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウム及び20mM塩酸スベルミジン、pH7.5)、9 $\mu$ lの滅菌蒸留水、それぞれ1 $\mu$ lの200mM DTT、2mg/mlの牛血清アルブミン、10mM ATP、10mM CTP、10mM GTP、10mM UTP、40ユニット/ $\mu$ l RNaseインヒビター(Promega社)を順次加え、37℃で60分間反応させた。次に、この溶液に5mg/ml DNaseIを1 $\mu$ l加え、37℃で15分間反応させ、フェノール抽出により精製して、最終的に89.9mg/mlのスタンダードRNA溶液を調製した。

【0086】このスタンダード溶液は、313ntのRNAからなることから4.9 $\times 10^{14}$ コピー/ $\mu$ lに相当する。

【0087】上記RNAスタンダード溶液を0.2mg/mlウシ胸腺tRNA(Boehringer Mannheim社)溶液で希釈して、10<sup>1</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>2</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>3</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>4</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>5</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>6</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>7</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>8</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>9</sup>コピー/ $\mu$ l及び10<sup>10</sup>コピー/ $\mu$ lの各溶液を調製して、RNAスタンダード系列を得た。

#### 【0088】2-4. RNAスタンダードによる $\beta$ -actin mRNAの定量

2-3で調製したRNAスタンダード系列を用いて、培養細胞K562における $\beta$ -actin mRNAを以下の通り競合定量した。

【0089】即ち、K562細胞よりAGPC法によってRNAを抽出した。即ち、K562細胞にD液(4M グアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム、0.5%ザルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール、pH7.0)500 $\mu$ lを加え、酢酸ナトリウム50 $\mu$ l、水飽和フェノール450 $\mu$ l及びクロロホルム/イソアミルアルコール(49:1)100 $\mu$ lを順次添加し、10分間激しく混和した。速やかに15分間氷冷し、遠心分離(1500rpm、10分間)して、上層を新しいチューブにとり、イソプロパノール500 $\mu$ lをこれに加えた。転倒混和后、-80℃で10分間冷却し、遠心分離(1500rpm、10分間)して、上清を取り除き、真空デシケーターにて吸引乾燥し、これに滅菌蒸留水を適量加え、沈殿を溶解しトータルRNA溶液とし、OD260での吸光度を測定して、トータルRNA濃度を定量した。

【0090】次いで、トータルRNAを3本のチューブにそれぞれ0.25 $\mu$ gずつサンプリングし、それぞれに10<sup>3</sup>コピー/ $\mu$ l、10<sup>5</sup>コピー/ $\mu$ l及び10<sup>7</sup>コピー/ $\mu$ lのRNAスタンダード系列を1 $\mu$ lずつと、10pmol/ $\mu$ lのACT-RTプライマーを1 $\mu$ l

添加した後、全量が $7\mu\text{l}$ になるように滅菌蒸留水を加えた。 $80^{\circ}\text{C}$ で5分間加温して直ちに氷中で冷却し、逆転写酵素溶液 $8\mu\text{l}$ を添加して $37^{\circ}\text{C}$ で60分間反応させた。反応後、 $95^{\circ}\text{C}$ にて5分間加温して逆転写酵素を失活させてcDNA溶液とした。

【0091】得られた各cDNA溶液から $3\mu\text{l}$ を別のチューブにとり、 $20\text{pmol}/\mu\text{l}$ のACT-FプライマーとACT-Rプライマーをそれぞれ $1\mu\text{l}$ ずつ用い、Ampli Taq Gold (Perkin Elmer社)を用い、PCRで増幅した。PCR反応は $94^{\circ}\text{C}$ で12分間加温した後、 $94^{\circ}\text{C}$ で1分間、 $65^{\circ}\text{C}$ で2分間のサイクルを35回行った。

【0092】得られた各反応液 $10\mu\text{l}$ につき3%アガロースゲル電気泳動を行った。その結果を図4に示す。

【0093】該図4に示される $493\text{bp}$ のバンドはK562の $\beta\text{-actin}$ ・mRNA由来のものであり、 $176\text{bp}$ のバンドは、添加したスタンダードRNA由来のものである。

【0094】之等 $493\text{bp}$ と $176\text{bp}$ のバンドが明瞭に認められるRNAスタンダード系列の $10^7$ コピー/ $\mu\text{l}$ を添加したレーンを、ビデオデンストメータTIAS-2300S (ACIジャパン社)を用いて、デンストメトリー法により解析し、2本のバンドの発光強度の比を求めた。これは映像をビデオカメラを用いて $512 \times 512$ 画素、256階調の濃度データとして、画像処理装置TIAS-2300Sにて取り込み、パソコンPC9800で演算処理して画像上のスポットの定量を行うことにより求めた。

【0095】上記より、K562の $\beta\text{-actin}$ ・mRNA量は、 $3.53 \times 10^6$ コピー/ $\text{ml}$ と計算された。この結果より、本発明の定量法による $\beta\text{-actin}$ ・mRNAの定量が可能となった。

【0096】

【実施例3】補正競合RT-PCR法によるヒトWT1・mRNAの定量

3-1. RNAスタンダード系列を用いて得たヒトWT1 mRNAの定量

実施例1の1-4. に示したRNAスタンダード系列を用いて、競合定量法によって培養細胞K562におけるWT1・mRNA量を求めた結果は、 $7.77 \times 10^6$ コピー/ $\text{ml}$ と計算された。

【0097】3-2. RNAスタンダード系列を用いて得たヒト $\beta\text{-actin}$ ・mRNAの定量

実施例2の2-4. に示したRNAスタンダード系列を用いて、競合定量法によって培養細胞K562における $\beta\text{-actin}$ ・mRNAを求めた結果は、 $3.53 \times 10^6$ コピー/ $\text{ml}$ と計算された。

【0098】3-3. WT1・mRNA発現量比の算出  
上記WT1・mRNA定量値 $7.77 \times 10^6$ コピー/ $\text{ml}$ を、同 $\beta\text{-actin}$ ・mRNA定量値 $3.53 \times 10^6$ コピー/ $\text{ml}$ で除算し、内部標準物質である $\beta\text{-actin}$ ・mRNA発現に対するWT1・mRNAの発現量比2.20を算出した。

【0099】3-4. 健康人単核球における $\beta\text{-actin}$ ・mRNA発現量の平均値の設定

39人の健康人から末梢血を採取した後、Ficoll Paque (Pharmacia社)を用い単核球を分取し、実施例1の1-1.と同様にしてRNAを抽出後、トータルRNA $1\mu\text{g}$ を用いて、 $\beta\text{-actin}$ ・mRNA発現量を算出し、39人の健康人単核球における $\beta\text{-actin}$ ・mRNA発現平均値 $10^{6.86}$ コピー/ $\mu\text{g}$ -トータルRNAと変動係数1.75%を得た。

【0100】3-5. WT1・mRNA発現量補正值の算出

上記3-3.で算出したWT1・mRNA発現量比2.20に、上記3-4.で算出した健康人単核球における $\beta\text{-actin}$ ・mRNA発現平均値 $10^{6.86}$ コピー/ $\mu\text{g}$ -トータルRNAを乗算することにより、K562におけるWT1・mRNA発現量補正值は、 $9.44 \times 10^6$ コピー/ $\mu\text{g}$ -トータルRNAであると定量することができた。

【0101】

【配列表】

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Ostuka Pharmaceutical Co., Ltd.

(ii) TITLE OF INVENTION: 補正競合RT-PCR法によるヒトWT1発現定量法

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 12

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:

(B) FILING REFERENCE: 2107JP

(C) FILING DATE: 24-September-1997

## 【0102】

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 184 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to genomic RNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

GGCATCTGAG ACCAGTGAGA AGCTGTCCCA CTTACAGATG CATGGTGAGG TGAACAATGT	60
TCCGGAGACT CTAAGGCCTC CCGATACAGA GCAGAGGCGG TGTCGAGGAG ATCTCGAATA	120
GAAGGAAAGA AGTCAGAAGG CAACTCCAG CTGGCGCTTT GATGACGAAA GTTCAGACTG	180
AGAG	184

## 【0103】

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 197 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to genomic RNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GTGGGGCGCC CCAGGCACCA CCAACCGCGA GAAGATGACC GCCTCCAAGC TGTGCCTTGG	60
GTGGCTTTGG GGCATGGACA TTGACCCGTA TAAAGAATTT GGAGCTTCTG TGGAGTTACT	120
CTCTTTTTTG CCTTCTGACT TCTTCTTTC TTCCTCACCG AGCGCGGCTA CAGGAAATCG	180
TGCGTGACAT TAAGGAC	197

## 【0104】

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 69 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

GGCATCTGAG ACCAGTGAGA AGCTGTCCCA CTTACAGATG CATGGTGAGG TGAACAATGT	60
TCCGGAGAC	69

## 【0105】

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 70 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GAGAGTCAGA CTTGAAAGCA GTTCAAAGCG CCAGCTGGAG TTGCGCTTCT GACTTCTTTC	60
CTTCTATTTCG	70

## 【0106】

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:  
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 21 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear  
 (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:  
 AGAGTCAGAC TTGAAAGCAG T 21
- 【0107】
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:  
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 21 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear  
 (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:  
 GGCATCTGAG ACCAGTGAGA A 21
- 【0108】
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:  
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 21 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear  
 (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:  
 TCAAAGCGCC AGCTGGAGTT T 21
- 【0109】
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:  
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 64 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear  
 (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:  
 GTGGGGCGCC CCAGGCACCA CCAACCGCA GAAGATGACC GCCTCAAGC TGTGCCTTGG 60  
 GTGG 64
- 【0110】
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:  
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 67 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear  
 (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid  
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:  
 CTCCTTAATG TCACGCACGA TTCCTGTAG CCGCGCTCGG TGAGGAAGAA GGAAAGAAGT 60

CAGAAGG

67

## 【 0 1 1 1 】

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 25 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:
- CTCCTTAATG TCAGCACGA TTTCC

25

## 【 0 1 1 2 】

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:
- GTGGGGCGCC CCAGGCACCA

20

## 【 0 1 1 3 】

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:
- TGTAGCCGCG CTCGGTGAGG A

21

## 【 図面の簡単な説明 】

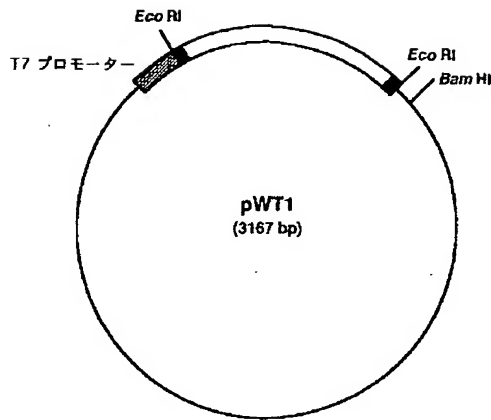
【 図 1 】 プラスミド pWT1 の制限酵素地図を示す。

【 図 2 】 実施例 1 の 1 - 4 に示す検体 RNA と WT1 - RNA スタンダードとを用いた競合定量法に従い得られる、PCR 増幅された cDNA のアガロースゲル電気泳動結果を示す図面代用写真である。

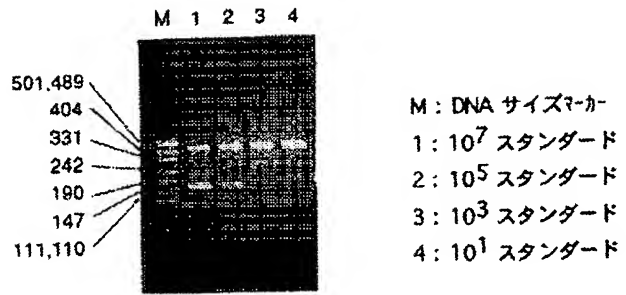
【 図 3 】 プラスミド pACT の制限酵素地図を示す。

【 図 4 】 実施例 2 の 2 - 4 に示す検体 RNA と  $\beta$ -アクトチン-RNA スタンダードとを用いた競合定量法に従い得られる、PCR 増幅された cDNA のアガロースゲル電気泳動結果を示す図面代用写真である。

【図1】



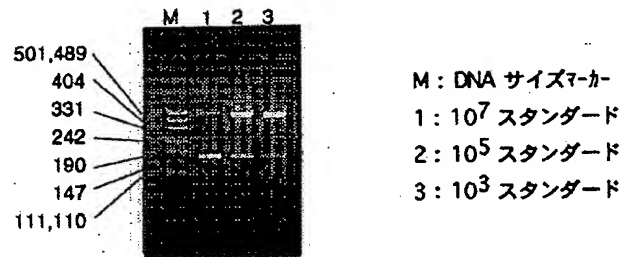
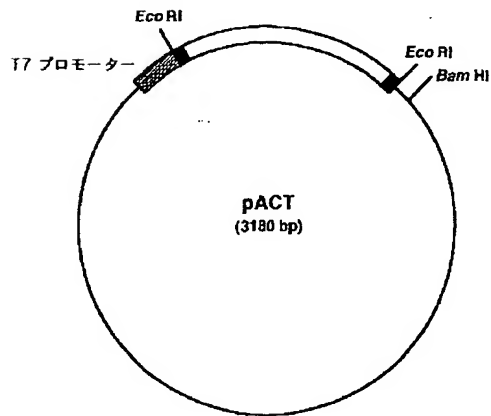
【図2】



図面代用写真

【図4】

【図3】



図面代用写真

